

Dendritic cell tumor vaccine and its preparation and use**Publication number:** CN1607247**Publication date:** 2005-04-20**Inventor:** WANG JIANLI (CN); WANG BAOMEI (CN); XIA DAJING (CN)**Applicant:** SHANGHAI HAIXIN BIO TECH CO LT (CN)**Classification:****- International:** A61K39/00; A61K45/00; A61P35/00; C12N5/08; C12N5/10; A61K39/00; A61K45/00; A61P35/00; C12N5/08; C12N5/10; (IPC1-7): C12N5/08; A61K39/00; A61K45/00; A61P35/00; C12N5/10**- European:****Application number:** CN200310107908 20031015**Priority number(s):** CN200310107908 20031015**Report a data error here****Abstract of CN1607247**

Said invention provides tumor antigen mRNA sensitized dendritic cell tumor vaccine, preparation and use thereof, and medicinal composition of dendritic cell. Said tumor vaccine is specific mRNA modified dendritic cell vaccine which can stimulate body to produce specific immune response aiming at HER2 positive tumor, so it can be used in preventing and curing HER2 positive tumor such as breast cancer etc. said invention has high transfection efficiency, wide anti tumor gammarayspectrum and strong specificity.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 5/08

C12N 5/10

A61K 45/00

A61K 39/00

A61P 35/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310107908.4

[43] 公开日 2005 年 4 月 20 日

[11] 公开号 CN 1607247A

[22] 申请日 2003. 10. 15

[21] 申请号 200310107908.4

[71] 申请人 上海海欣生物技术有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园
区哈雷路 1043 号 501 室

[72] 发明人 王建莉 王宝梅 夏大静

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 2 页

[54] 发明名称 树突状细胞肿瘤疫苗及其制法和用途

[57] 摘要

本发明提供了一种肿瘤抗原 mRNA 致敏的树突状细胞肿瘤疫苗及其制备方法和用途。本发明还提供了含所述树突状细胞的药物组合物。本发明的肿瘤疫苗为一种采用特异性 mRNA 修饰的树突状细胞疫苗,可以明显刺激机体产生针对诸如 HER2 阳性肿瘤的特异性免疫应答,因而可用于 HER2 阳性肿瘤如乳腺癌等肿瘤的预防及治疗。本发明制法的转染效率高且简便,制得的疫苗抗肿瘤谱广,特异性强。

ISSN 1008-4274

1.一种肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

5 (a)将树突状细胞与肿瘤抗原mRNA以 1×10^6 细胞 $\sim 1 \times 10^7$ 细胞: 10 \sim 50微克HER2 mRNA混合,形成混合物;

(b)将所述混合物在 $0 \pm 4^\circ\text{C}$ 放置 15 ± 10 分钟;

(c)将所述混合物在以下条件下进行电穿孔: $505 \pm 50 \text{ V}$ 、 $99 \pm 10 \mu\text{s}$ 、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 $10 \pm 2 \text{ s}$;

10 (d)将电穿孔后的混合物在 $0 \pm 4^\circ\text{C}$ 放置 15 ± 10 分钟;

(e)将混合物在适合树突状细胞生长的条件下培养10-30小时;

(f)加入成熟诱导剂使树突状细胞成熟;

(g)收集成熟的树突状细胞。

2.如权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(a)中,树突状细胞与HER2
15 mRNA的以 2×10^6 细胞 $\sim 8 \times 10^6$ 细胞: 15 \sim 40微克HER2 mRNA混合。

3.如权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤(a)中,所述的肿瘤抗原mRNA是HER2 mRNA。

4.如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述的HER2 mRNA是HER2阳性肿瘤细胞的总mRNA,或转入外源HER2编码序列的宿主细胞的mRNA。

20 5.如权利要求4所述的方法,其特征在于,所述的HER2阳性肿瘤细胞是源自乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌、或原发性肾细胞癌的细胞系;而所述的宿主细胞是人乳腺癌细胞系MCF-7或小鼠结肠癌细胞系CT26。

6.如权利要求1所述的方法,其特征在于,

25 步骤(c)的条件是 $505 \pm 25 \text{ V}$ 、 $99 \pm 5 \mu\text{s}$ 、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 $10 \pm 1 \text{ s}$;

步骤(e)的所述条件是在 $37 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $5 \pm 2\% \text{ CO}_2$ 孵箱中培养;

步骤(f)的条件是加入TNF- α 刺激 24 ± 8 小时。

7.如权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括步骤(h):对步骤(g)收集成熟的树突状细胞进行灭活。

8.一种肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群，其特征在于，所述细胞群中60%-99%树突状细胞的胞内含有导入的外源肿瘤抗原mRNA。

9. 如权利要求8所述的细胞群，其特征在于，所述细胞群中80%-99%树突状细胞的胞内含有导入的外源肿瘤抗原mRNA，且所述的肿瘤抗原mRNA是
5 HER2 mRNA。

10.一种药物组合物，其特征在于，它含有有效量的权利要求8所述的肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群，以及药学上可接受的载体、赋型剂和/或稀释剂。

树突状细胞肿瘤疫苗及其制法和用途

5 技术领域

本发明涉及生物学和医学领域，更具体地涉及一种肿瘤抗原mRNA(如HER2 mRNA)致敏的树突状细胞肿瘤疫苗及其制备方法和用途。

背景技术

10 HER2是人类肿瘤中常见的癌基因，与肿瘤的发生、发展密切相关，是表皮生长因子受体(EGFR)家族的第二位成员。表皮生长因子受体家族，也称为HER或ErbB2家族，在细胞信号转导中发挥重要作用，是细胞生长、分化及存活的重要调节者。

人HER2基因定位于17号染色体短臂，表达产物为分子量185KDa的单链跨膜糖蛋白，即p185。p185含有1255个氨基酸残基，细胞内段具有酪氨酸激酶活性，是一种酪氨酸激酶受体。正常情况下，与配体结合后，HER2与EGFR、HER3(erbB3)或HER4(erbB4)形成异二聚体，导致这些受体的磷酸化，启动一个信号链导致下游信号分子的活化，调控细胞的生长。HER2的过度表达能引起HER2同二聚体的激活而无需配体的结合，从而引起不受控制的细胞生长和癌基因的转化。

20 通常情况下，HER2只在胎儿时期表达，到成年以后，用免疫组化染色只能在极少组织内发现其低水平表达于细胞表面。

在人类癌症，多种肿瘤组织均存在HER2过度表达，如乳腺癌(25%-30%)、卵巢癌(25%-32%)、肺腺癌(30%-35%)、原发性肾细胞癌(30%-40%)等。大多数病例中HER2过度表达是基因扩增引起的。HER2基因的扩增导致HER2基因转录增加，受体的合成增加，在细胞表面的表达增加。HER2蛋白水平在HER2阳性细胞表面比相邻的正常乳腺上皮高几个数量级。

25 已知HER2阳性状态与乳腺癌的预后较差有关，这种关系提示HER2阳性可能在癌的发生方面起关键作用。日益增多的证据支持HER2可作为乳腺癌化疗

和激素治疗的重要的反应预示指标。HER2过度表达在乳腺癌细胞表面的发生率和已明确的预后价值，意味着HER2是重要的治疗靶点。

HER2蛋白低量表达于某些正常细胞，为一种自身蛋白。自身反应性T细胞识别并对自身显性表位耐受，而对次显性表位未产生耐受。自身蛋白通常不能诱导出免疫反应。以截断的不含显性表位HER2蛋白或HER2次显性表位肽免疫能产生对次显性表位的免疫反应。

近年来以HER2为靶点的抗肿瘤治疗在HER2抗体、肽疫苗、DNA疫苗等方面取得很大进展。

HER2抗体：美国FDA已批准人源化的抗HER2单克隆抗体-trastuzumab (Herceptin) 用于治疗晚期乳腺癌。临床研究显示它能有效抑制体内HER2高表达乳腺癌细胞的增殖，显著延长HER2阳性乳腺癌病人的生存期。但用HER2抗体进行治疗的费用昂贵，且Herceptin治疗具有一定的心脏毒性。

HER2肽疫苗：Ikuta等人合成一种与H-2Kd连接、鼠HER2来源肽HER2P780。HER2P780免疫后能诱导鼠HER2特异性CTL产生。用HER2过度表达肿瘤细胞建立BABL/C荷瘤小鼠后，再以HER2P780致敏的DC接种，可有效抑制肿瘤生长。但HER2的肽类疫苗往往免疫原性较弱、局限于某些表位并受病人个体的单倍型限制，对肿瘤的治疗或预防意义有限。

HER2DNA疫苗：DNA疫苗亦称基因疫苗或核酸疫苗，是指构建携带目的基因的重组真核表达质粒，将重组质粒做为疫苗通过各种方式导入动物体内，直接免疫机体，转染宿主细胞，使载体上的基因在体内持续表达出天然抗原物质，这些目的蛋白经正确的糖基化修饰等加工处理后，与主要组织相容性复合物(MHC)分子形成复合物并被提呈到细胞表面，诱导机体产生特异性细胞免疫和体液免疫，尤其是能诱导产生具细胞毒杀伤性功能的T淋巴细胞(CTL)。HER2是一种原癌基因，以其全长基因进行免疫可能引起细胞转化。HER2胞外区基因片段包含多个已被证明的CTL表位，利用胞外区基因片段进行免疫，提高了其安全性，并期望暴露一些次要抗原表位，达到打破机体免疫耐受的状态。Pilon等以HER2的胞外区免疫小鼠，可以有效地在小鼠体内诱发特异性CTL应答，而且对HER2阳性肿瘤细胞在体内生长有明显的抑制作用。但DNA疫苗普遍存在抗原基因表达量低，所诱导的免疫应答不足的缺点。

树突状细胞肿瘤疫苗是新一代的肿瘤疫苗,这种新型疫苗的特点是采用机体内功能最强的抗原递呈细胞树突状细胞作为瘤苗载体(或称佐剂),以肿瘤抗原体外冲击使其致敏,不仅可以保证肿瘤抗原被有效地摄取,而且可以提供所需的共刺激信号,显示了优于“常规”疫苗的前景。

- 5 树突状细胞(dendritic cell, 简称为“DC”)是目前发现的功能最强大的抗原递呈细胞(APC), DC系统作为机体内免疫反应的始动者和调解者,具有强大的激活CD8+ CTL和CD4+ T辅助细胞的能力,控制着体内免疫应答反应的过程,因而成为抗肿瘤免疫反应的中心环节。近年来随着体外大量扩增DC和制备DC疫苗技术的日趋成熟,采用DC疫苗进行抗肿瘤治疗已成为当今肿瘤生物治疗领域备受关注的焦点之一。

- 10 动物实验表明,用肿瘤抗原肽、蛋白、肿瘤细胞DNA或RNA等体外冲击致敏DC并回输体内可诱导机体产生较强的抗肿瘤免疫应答,甚至可治疗已建立的低免疫原性肿瘤。国外, DC作为新的肿瘤治疗手段已进入I/II期临床试验阶段。在I/II期临床试验阶段中, DC疫苗能激发特异性抗肿瘤免疫应答,未观察到明显的不良反应。

- 15 美国西雅图西北医院以Murphy为首的小组选择前列腺特异性抗原(PSMA)的HLA-A0201特异性抗原多肽(PSM-P)体外冲击致敏外周血来源自体DC,回输治疗了51例对激素疗法无效的前列腺癌病人,他们将病人分为5组(每例回输4~5次),其中第1, 2组病人分别单独回输抗原多肽PSM-P1或PSM-P2,第3组病人回输自体DC,第4、5组分别回输PSM-P1或PSM-P2体外冲击致敏的自体DC,结果表明,所有病人均未出现毒副作用,在第4、5组HLA-A2+病人中均观察到针对PSM-P2的细胞免疫反应增强,第5组病人PSA水平下降,7例病人病情缓解,进一步观察表明,该治疗作用能持续较长时间。表明该疗法具有一定的临床应用的可行性,并发表了II期临床试验报告。

- 25 美国学者Fong还观察了抗原致敏的DC瘤苗不同途径免疫包括静脉、皮下、淋巴结周围注射时对抗肿瘤免疫功能的诱导作用,对32例经治疗病人的分析表明,三种注射方式均产生了特异性细胞免疫反应,皮下、淋巴结周围注射时还能诱导机体产生IFN- γ ,而静脉注射也检测到体液免疫反应。

Nestle等应用黑色素瘤抗原肽或肿瘤裂解物致敏的DC治疗了16例黑色素

瘤病人并观察了其治疗反应，结果在5例病人取得了一定治疗效果，多处转移灶消退，在所有病人中均未检测到自身免疫反应的发生，11例病人中检测到针对多肽的迟发型变态反应。Rieser等将此疗法用于治疗肾癌，也取得一定疗效。

目前DC疫苗在乳腺癌中的治疗研究主要包括以下4种类型：

- 5 **1.DC与乳腺癌细胞融合：**DC与肿瘤细胞融合，一方面可表达DC自身相关的表面免疫分子并分泌相应的细胞因子，另一方面又可同时获得肿瘤细胞的肿瘤抗原信息，在体内外诱导出特异性CTL应答。Gong 等将乳腺癌患者的乳腺癌细胞与自身的DC进行融合，融合后的细胞既能表达肿瘤相关抗原，也能表达DC来源的免疫分子和共刺激分子，诱导出抗自身肿瘤细胞的特异性CTL免疫应答。
- 10 采用肿瘤细胞与DC的融合细胞作为瘤苗的缺点是：其制备周期更长，融合率低，体外操作复杂，具有许多的不确定性，难以临床大规模应用。

- 2.肿瘤抗原多肽刺激DC：**DC及肿瘤细胞抗原多肽的联合应用可提高肿瘤细胞的免疫原性，更有效的激发抗肿瘤免疫应答。目前研究大多集中在HER2与MUC-1两种肿瘤相关抗原，并已应用于临床试验。应用抗原多肽刺激DC是目前DC瘤苗较常采用的方法，具有很好的靶向性，可以刺激机体产生肿瘤特异性的免疫应答，避免不必要的免疫刺激。但是该方法的缺点是：大部分肿瘤的特异性抗原尚未明确且肿瘤发生的抗原突变能抵抗单一抗原的免疫攻击，不利于其在其它肿瘤治疗上的应用。
- 15

- 3.肿瘤抗原基因转染DC：**将肿瘤抗原的编码基因转染DC，能在DC内持续表达肿瘤抗原，既克服了肽与DC负载后MHC-抗原多肽复合物的解离问题，又能使表达的抗原有效地与MHC分子结合并递呈给CTL。但缺点是：由于需要采用载体介导基因转染，制备过程较为复杂，而且由于DC是分化终末期细胞，其转染效率较低而且备选的载体也有限，不适合其大规模使用。此外，直接使用组成型表达肿瘤抗原的DC有潜在的致癌危险。
- 20

- 25 **4.细胞性肿瘤抗原体外致敏DC：**Fields等在小鼠动物模型上，用乳腺癌细胞碎片体外冲击致敏骨髓细胞来源的DC，在体内外试验中，均诱导出特异性抗肿瘤免疫应答。直接利用超声波破碎或反复冻融等方法制备的肿瘤细胞性抗原虽更具实用价值，但缺点是在临床上难以提供所需的大量瘤体组织。

最近的研究显示，用肿瘤RNA致敏的DC疫苗，能提供更多更有效的可供

识别的抗原表位，并可克服HLA限制，从而能持续刺激CTL的激活增殖，是一种最具发展前景的DC疫苗制备方法。

与其它种类的DC疫苗相比，肿瘤RNA致敏的DC疫苗有以下优点：

- (1)无需明确肿瘤特异性抗原，应用范围广；
- 5 (2)对于来源有限的肿瘤组织，通过核酸扩增出肿瘤RNA或相应的cDNA文库，不仅可降低肿瘤组织的需求量，还可以提高或纯化肿瘤相关抗原在DC表面的浓度，提高抗肿瘤免疫应答的强度；
- (3)mRNA可编码多种抗原表位，递呈给不同的HLA表位，可扩展免疫的范围到每个肿瘤患者，而不依赖于他们的基因背景；
- 10 (4)从临床应用角度，以mRNA编码的形式递送特异性的肿瘤相关抗原更具吸引力，因为与蛋白质相比mRNA更易获得及纯化；
- (5)应用转染电穿孔等技术可显著提高RNA的转染效率，转染DC的能力可与重组病毒相当，如牛痘病毒或腺病毒，但又避免了病毒载体的缺陷；
- (6)用差异筛选法或减数杂交等方法筛选出肿瘤特异性mRNA，用于冲击
- 15 DC或直接导入DC用来治疗肿瘤，既可产生显著的抗肿瘤免疫反应，又可避免诱发自身免疫性疾病；
- (7)由于在哺乳动物细胞中即使稳定的mRNA的半衰期也小于24小时，因此几乎不存在整合到宿主基因组的危险性。

美国杜克大学Eli Gilboa实验室率先将编码肿瘤抗原的RNA转染DC，体外

20 诱发出肿瘤特异性CTL免疫反应。Boczkowski等人发现用编码卵清白蛋白(ovalbumin, OVA)的RNA转染DC细胞后，再用此种RNA致敏的DC免疫，可在体内、外诱导出强烈的OVA特异性CTL应答，其反应强度要高于单纯用OVA肽致敏的DC所引起的CTL反应，并可保护小鼠抵御表达OVA的肿瘤细胞的攻击；

 用来源于恶性黑色素瘤B16/F9.10细胞的总RNA或mRNA致敏的DC免疫小鼠，

25 可显著减少肿瘤的肺转移。

Schmitt等尝试使用膀胱癌患者肿瘤细胞来源的mRNA转染患者自体DC，体外检测其诱导自体T细胞杀伤肿瘤细胞的能力。结果表明，转染后的DC能有效激活可识别自体肿瘤细胞的T细胞，当效靶比为50:1时，其细胞毒性约为26%，这一结果为人类临床试验研究提供了有利的依据。

前列腺癌已发现具有特异的抗原成分PSA, Heisser的临床前实验表明PSA-mRNA转染的DC能有效激活抗原特异性CTL, 即使针对与PSA相似的同时产生kallikrein 抗原也不发生交叉反应, 提示不会引起有害的自身免疫反应, 健康志愿者或前列腺癌患者的体外试验表明, PSA-mRNA转染的DC同样可诱导PSA特异的CTL。Heiser在此基础上对13例前列腺癌患者进行I期临床试验, 逐渐增加PSA-mRNA转染的DC用量, 未产生剂量依赖的毒性和自身免疫的副反应, 所有患者均能持续测到PSA特异性的T细胞反应, 在7例中有6例的PSA水平明显下降, 证明该治疗是安全和有效的。

端粒酶活性增强是多种肿瘤的共性表现, 用端粒酶多肽复合物(TERT)RNA转染DC, 体外观察发现有明显的肾及前列腺癌细胞溶解现象, 故转染TERT的DC对肾癌、前列腺癌、EB病毒转染的B淋巴细胞产生同样的特异性CTL。

用于致敏DC的RNA可以通过体外转录得到的编码确定抗原的RNA或来源于肿瘤细胞的总RNA。用肿瘤细胞总RNA致敏的DC比单个肿瘤抗原RNA致敏的DC在裂解肿瘤靶细胞时更有效。到底选择何种RNA很大程度上依赖于所要开发的DC疫苗的类型、是否有明确的肿瘤抗原及可能得到的肿瘤的量。当无明确的肿瘤抗原, 或希望诱导抗广谱肿瘤抗原的免疫反应时, 可选用总的细胞RNA致敏DC, 这种方法需要有足够的外科切除或活检肿瘤组织。当有明确的肿瘤抗原时, 可通过体外转录得到大量的肿瘤抗原RNA致敏DC, 而无需外科切除的瘤体组织。

另外, 也可以RT-PCR扩增出来的cDNA库为模板, 通过体外转录产生大量的肿瘤抗原RNA, 当肿瘤组织有限和/或很难得到时, 这方法特别有用。

Boczkowski和Heiser用从冰冻组织切片或针吸活检的肿瘤组织扩增出来的RNA致敏DC在体外可有效激发肿瘤特异性的CTL反应。事实上, 体外转录得到的肿瘤抗原RNA量是无限制的, 因此, 可有充足的抗原用于临床试验。最近应用体外转录的前列腺特异抗原(PSA)进行的I期临床实验证实了体外转录RNA转染的DC疫苗的可行性及安全性。

综上所述, 目前用肿瘤RNA致敏的DC疫苗最有发展前景。然而, 在用肿瘤RNA致敏DC时的转染效率都较低(通常低于50%), 因此限制了肿瘤RNA致敏的DC疫苗的临床使用。因此, 本领域迫切需要开发高效地用肿瘤RNA转染树突

状细胞的方法。

发明内容

本发明的目的就是提供一种高效地用肿瘤RNA转染树突状细胞的方法。

- 5 本发明的另一目的是提供用所述方法制备的DC肿瘤疫苗及其在治疗和预防肿瘤(如乳腺癌等)方面用途。

在本发明的第一方面,提供了一种肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的方法,它包括以下步骤:

- 10 (a)将树突状细胞与肿瘤抗原mRNA以 1×10^6 细胞 $\sim 1 \times 10^7$ 细胞: 10 \sim 50微克HER2 mRNA混合,形成混合物;
- (b)将所述混合物在 $0 \pm 4^\circ\text{C}$ 放置 15 ± 10 分钟;
- (c)将所述混合物在以下条件下进行电穿孔: 505 ± 50 V、 $99 \pm 10 \mu\text{s}$ 、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 10 ± 2 s;
- 15 (d)将电穿孔后的混合物在 $0 \pm 4^\circ\text{C}$ 放置 15 ± 10 分钟;
- (e)将混合物在适合树突状细胞生长的条件下培养10-30小时;
- (f)加入成熟诱导剂使树突状细胞成熟;
- (g)收集成熟的树突状细胞。

- 在另一优选例中,在步骤(a)中,树突状细胞与HER2 mRNA的以 2×10^6 细胞 $\sim 8 \times 10^6$ 细胞: 15 \sim 40微克HER2 mRNA混合。更佳地,混合比例为 3×10^6 细胞 $\sim 7 \times 10^6$ 细胞: 20 \sim 40微克HER2 mRNA。
- 20

- 在另一优选例中,在步骤(a)中,所述的肿瘤抗原mRNA是HER2 mRNA。更佳地,所述的HER2 mRNA是HER2阳性肿瘤细胞的总mRNA,或转入外源HER2编码序列的宿主细胞的mRNA。更佳地,所述的HER2阳性肿瘤细胞是源自乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌、或原发性肾细胞癌的细胞系;而所述的宿主细胞
- 25 是人乳腺癌细胞系MCF-7或小鼠结肠癌细胞系CT26。

在另一优选例中,HER2 mRNA编码全长HER2或其胞外区片段。

在另一优选例中,步骤(c)的条件是 505 ± 25 V、 $99 \pm 5 \mu\text{s}$ 、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 10 ± 1 s;

步骤(e)的所述条件是在 $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ ， $5\pm 2\%$ CO_2 孵箱中培养；

步骤(f)的条件是加入TNF- α 刺激 24 ± 8 小时。

在另一优选例中，所述的方法还包括步骤(h)：对步骤(g)收集成熟的树突状细胞进行灭活(如用约30Gy的放射线照射)。

- 5 在本发明的第二方面，提供了一种肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群，所述细胞群中60%-99%树突状细胞的胞内含有导入的外源肿瘤抗原mRNA。

在另一优选例中，所述细胞群中80%-99%(更佳地85-99%，最佳地90-99%)树突状细胞的胞内含有导入的外源肿瘤抗原mRNA，且所述的肿瘤抗原mRNA是HER2 mRNA。

- 10 在另一优选例中，所述的树突状细胞是人的树突状细胞。

在本发明的第三方面，提供了一种药物组合物，它含有有效量的本发明上述的肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群，以及药学上可接受的载体、赋型剂和/或稀释剂。

在另一优选例中，该肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群是灭活的。

- 15 在另一优选例中，所述的药物组合物是用于肿瘤的疫苗。

在本发明的第四方面，提供了一种本发明的肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群的用途，它们被用于制备预防和/治疗肿瘤的药物。

附图说明

- 20 图1显示了HER2 mRNA致敏树突状细胞体外诱导正常人外周血细胞毒T淋巴细胞的杀伤活性。

图2显示了HER2 mRNA致敏树突状细胞体外诱导HER2阳性肿瘤患者外周血细胞毒T淋巴细胞的杀伤活性。

- 25 图3显示了HER2 mRNA致敏的树突状细胞疫苗免疫诱导小鼠T淋巴细胞对HER2⁺-CT26肿瘤细胞的杀伤活性。

图4显示了经HER2 mRNA致敏的树突状细胞疫苗免疫后荷瘤小鼠的存活曲线。

具体实施方式

本发明人经过深入而广泛的研究, 改进了肿瘤抗原mRNA转染树突状细胞的电穿孔参数, 导致显著提高了转染效率, 从而可以高效制备用肿瘤RNA转染树突状细胞。在此基础上完成了本发明。

5 术语

如本文所用, 术语“肿瘤抗原mRNA”和“肿瘤RNA”可互换使用, 指含有编码肿瘤抗原的核酸序列的mRNA。它可以是(a)一种仅编码和翻译某一肿瘤抗原的mRNA, 也可以是(b)编码和翻译多种肿瘤抗原的mRNA的混合物, 还可以是(c)由(a)、(b)与其他不编码肿瘤抗原的mRNA构成的混合物。

- 10 如本文所用, 术语“HER2 mRNA”指含有编码HER2核酸序列(全长HER2或其胞外区片段)的mRNA, 它可以是纯净物, 也可以是混合物。代表性的例子包括(但并不限于): HER2阳性肿瘤细胞的总mRNA, 或转入外源HER2编码序列的宿主细胞的mRNA。所述的HER2阳性肿瘤细胞是源自乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌、或原发性肾细胞癌的细胞系; 而所述的宿主细胞是各种常用的真核宿主
- 15 细胞, 尤其是哺乳动物细胞, 如人乳腺癌细胞系MCF-7或小鼠结肠癌细胞系CT26。

如本文所用, 术语“本发明的树突状细胞”指用肿瘤抗原mRNA致敏的从而在胞内含有导入的外源肿瘤抗原mRNA的树突状细胞。

20 肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞及其制法

适用于本发明的肿瘤抗原mRNA和树突状细胞可用本发明常规的方法制备。

在制备肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞时, 可采用本发明的电穿孔方法, 它包括步骤:

- 25 (a)将树突状细胞与肿瘤抗原mRNA以 1×10^6 细胞 $\sim 1 \times 10^7$ 细胞: 10~50微克HER2 mRNA混合, 形成混合物;
- (b)将所述混合物在 $0 \pm 4^\circ\text{C}$ 放置 15 ± 10 分钟;
- (c)将所述混合物在以下条件下进行电穿孔: $505 \pm 50 \text{ V}$ 、 $99 \pm 10 \mu\text{s}$ 、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 $10 \pm 2 \text{ s}$;

- (d)将电穿孔后的混合物在 $0\pm 4^{\circ}\text{C}$ 放置 15 ± 10 分钟;
- (e)将混合物在适合树突状细胞生长的条件下培养10-30小时,
- (f)加入成熟诱导剂使树突状细胞成熟;
- (g)收集成熟的树突状细胞。

5 其中,最关键的是步骤(c)的电穿孔条件,当电穿孔超出 $505\pm 50\text{ V}$ 、 $99\pm 10\mu\text{s}$ 、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 $10\pm 2\text{ s}$ 时,转染效率会显著下降。

其次,步骤(a)中树突状细胞与肿瘤抗原mRNA的混合比例,当混合比例超出 1×10^6 细胞 $\sim 1\times 10^7$ 细胞: $10\sim 50$ 微克HER2 mRNA时,转染效率会下降。

至于步骤(e)、(f)、(g)等步骤,可采用本领域采用的条件。

10

药物组合物

用本发明方法制备的DC疫苗可以广泛应用于预防和治疗各种HER2阳性肿瘤,代表性的例子包括(但并不限于):乳腺癌、卵巢癌、肺腺癌、原发性肾细胞癌。

15 因此本发明还提供了一种用于预防和治疗各种HER2阳性肿瘤药物组合物,它含有安全有效量(如 10^4 - 10^8 个树突状细胞)的本发明上述的肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞的细胞群,以及药学上可接受的载体、赋型剂和/或稀释剂。这类载体包括(但并不限于):盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式,例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。诸如片剂和胶囊之类的药物组合物,可通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液、片剂和胶囊宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量,例如每天约 10^4 - 10^8 个树突状细胞,更佳地为 10^5 - 10^7 个树突状细胞。

20 配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药,其中包括(但并不限于):
25 肌内、腹膜内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药。

在治疗和预防肿瘤时,本发明的树突状细胞可以单用,还可同时和其他治疗剂(如TNF- α 、TNF- β 等)联用。

使用药物组合物时,是将安全有效量的肿瘤抗原mRNA致敏的树突状细胞施用于哺乳动物,其中该安全有效量通常每天约 10^4 - 10^8 个树突状细胞,更佳地

为 10^5 - 10^7 个树突状细胞。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

本发明的主要优点在于：

- 5 (a) 本发明的制法效率高、制备简便；
(b) 本发明的HER2 mRNA致敏的DC疫苗的抗肿瘤谱广，特异性强。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例1

15 高表达HER2肿瘤细胞株的建立及筛选

本发明采用以下引物

上游引物：5' CGCTCGAGCACCATGGAGCTGGCGGC 3' (SEQ ID NO:1)

下游引物：5' CGAAGCTTGAGCAGAGAGCCAGCCC 3' (SEQ ID NO:2)

应用标准的RT-PC方法从人乳腺癌细胞株SK-BR-3(可购自美国典型培养物保藏中心，ATCC HTB-30)中克隆入HER2原癌基因胞外区片段，经测序正确，插入pCDNA3.1(Invitrogen)，构建成HER2真核表达载体pCDNA3.1-HER2。采用常规的脂质体转染方法，将表达载体pCDNA3.1-HER2分别导入人乳腺癌细胞系MCF-7(可购自美国典型培养物保藏中心，ATCC HTB-22)及小鼠结肠癌细胞系CT26(可购自美国典型培养物保藏中心，ATCC CRL-26)，经G418选择培养，检测阳性克隆HER2基因表达，分别选出高表达HER2的乳腺癌细胞系MCF-7和小鼠结肠癌细胞系CT26。

实施例2

HER2 mRNA的制备及纯化

(a)HER2 mRNA的制备:

对于实施例1获得的高表达HER2的肿瘤细胞克隆(即高表达HER2的乳腺癌细胞系MCF-7或小鼠结肠癌细胞系CT26),进行大量扩增,然后收集细胞。用PBS洗两遍,弃上清,置冰浴。加异硫氰酸胍变性液(20ml/1×10⁸细胞),迅速混匀、使细胞快速、彻底地裂解。加入2ml 2mol乙酸钠(PH 4.0),混匀后移至50ml离心管中。加22ml酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混合用力振荡,冰上放置10min。小心吸取上层含有RNA的水相,转移至一新的50ml离心管中,加等体积的异戊醇,-20℃沉淀1小时。4℃离心,12000rpm×15min。弃上清,加70%乙醇洗一遍,4℃离心,12000rpm×15min。弃上清,真空干燥,溶于无RNase水中,-70℃冻存。

(b) HER2 mRNA的纯化:

用10 ml 4mol NaOH清洗硅烷化的柱子,将Oligo (dT)纤维素干粉加入1ml 0.1mol NaOH中注入柱内,用10ml无RNase水淋洗。10-20 倍柱体积的上样缓冲液平衡Oligo (dT),至PH值为7.5。70℃水浴加热RNA样品5分钟,迅速冷却至室温,加入适量的LiCl使其终浓度为0.5M。将RNA样品加入Oligo (dT)柱内,用1ml上样缓冲液洗柱,洗出液再过柱一次。用2ml洗脱缓冲液洗柱,洗脱出的mRNA液中加入7/10体积的乙酸氨,10倍体积预冷的无水乙醇,室温30分钟沉淀mRNA,4℃离心,12000rpm×15min。弃上清,加70%乙醇洗一遍,4℃离心,12000rpm×15min。弃上清,真空干燥,获得纯化的HER2 mRNA。将其溶于无RNase水中,-70℃冻存。如需长期保存,则溶于70%的乙醇中。

实施例3**HER2 mRNA致敏树突状细胞**

收集培养至第6天的人或小鼠体外培养的树突状细胞,用无血清RPMI 1640洗两遍,并用无血清RPMI 1640调节细胞浓度至1×10⁷/ml。取0.4ml细胞悬液加入0.2-cm的电击杯中,同时加入30μg HER2 mRNA,充分混匀。将电击杯冰浴10 min后,擦干,放入BTX公司ECM 830型电穿孔仪的电击槽中进行电穿孔,电穿孔参数为505 V、99μs、2个电脉冲、电脉冲间间隔10 s。电穿孔后,轻轻取出电击杯,冰浴10 min。小心取出细胞悬液加入新鲜的DC完全培养基,37℃

5% CO₂孵箱中继续培养20 h, 加入TNF- α 刺激24小时, 促进DC成熟, 收集细胞, 30 Gy放射线照射后备用。同时用EGFP mRNA转染树突状细胞经流式细胞仪检测, 以监测该方法的转染效率。

转染结果如表1所示, 平均转染效率高达97.4%。

5

表1 mRNA 以电穿孔方法转染 DC 的效率

批次	DC用量	mRNA用量	转染效率
1	4×10^6	30 μ g	97%
2	4×10^6	30 μ g	95%
3	4×10^6	30 μ g	98%
4	4×10^6	30 μ g	98%
5	4×10^6	30 μ g	99%
平均转染效率			97.4%

此外, 重复上述操作, 当电穿孔条件在 505 ± 50 V、 $99 \pm 10 \mu$ s、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 10 ± 2 s时, 转染效率维持在为80-95%或更高。电穿孔条件超出 505 ± 50 V、 $99 \pm 10 \mu$ s、 2 ± 1 个电脉冲、电脉冲间间隔 10 ± 2 s时, 转染效率明显下降。

10

实施例4

HER2 mRNA致敏树突状细胞的体内、体外抗肿瘤作用

在本实施例中, 测定实施例3制备的HER2 mRNA致敏树突状细胞的体内、体外抗肿瘤作用。

15

(a)人HER2 mRNA致敏树突状细胞体外诱导HER2特异性的细胞毒T淋巴细胞反应;

分离正常人和HER2阳性肿瘤患者外周血单个核细胞, 置37℃培养2小时后, 贴壁细胞用于培养树突状细胞, 非贴壁细胞用5%胎牛血清的RPMI 1640培养基悬浮, 过尼龙毛柱(37℃孵育1小时)。纯化的T淋巴细胞(2×10^6)与HER2 mRNA致敏树突状细胞(2×10^5)共培养于24孔板中, 同时加入重组人IL-7(10ng/ml; Peprotech Inc), 24 h后加入重组人IL-10 (10ng/ml; Peprotech Inc)。

20

培养的T细胞每周用HER2 mRNA致敏的经照射的自体树突状细胞刺激一次，共刺激三次。每次刺激后的24及48小时分别加入重组人IL-10(10ng/ml)、重组人IL-2(20IU/ml)。最后一次刺激后7天，收集体外诱导的细胞毒T淋巴细胞，用标准的4小时⁵¹Cr释放试验检测其特异性杀伤活性。用高表达HER2 MCF-7细胞(实施例1制备)及不表达HER2的HeLa细胞(购自ATCC)分别作为靶细胞，加入⁵¹Cr(100μCi/10⁶cells)，置37℃水浴中标记90分钟，每间隔15分钟轻混匀一次，洗3遍，彻底洗去残余Na₂⁵¹CrO₄，标记好的靶细胞用完全培养基调整细胞浓度为1×10⁵/ml，加入96孔圆底板，每孔100μl。按50: 1、25: 1、12.5: 1三个不同效靶比加入相应的CTL，37℃孵育4小时，收集各孔上清各100μl，用γ计数器检测cpm值。最大释放组各孔为单独的靶细胞加100μl 1% SDS；自发释放孔为单独的靶细胞加100μl完全培养基。按下式计算杀伤率：

$$\text{杀伤率(\%)} = (\text{实验组 cpm} - \text{自发释放组 cpm}) / (\text{最大释放组 cpm} - \text{自发释放组 cpm})$$

结果表明，HER2 mRNA致敏树突状细胞在体外可特异性地诱导正常人(图1)和HER2阳性肿瘤患者(图2)外周血细胞毒T淋巴细胞的杀伤HER2阳性肿瘤细胞的活性。

(b) 小鼠HER2 mRNA致敏树突状细胞的免疫及体内抗肿瘤作用的观察：

分离培养BABL/c小鼠树突状细胞，选用高表达HER2的小鼠肿瘤细胞系总mRNA致敏树突状细胞，制备树突状细胞疫苗。将30只BABL/c小鼠随机分为4组，即HER2 mRNA致敏DCs、DCs和PBS对照组。免疫方法为小鼠腹腔注射DCs疫苗，疫苗细胞数为1×10⁶/只免疫三次，间隔一周。末次免疫后10天，从各组随机取三只小鼠，无菌操作摘取小鼠脾脏，溶解红细胞，制成单细胞悬液。将脾细胞悬液(5×10⁶/ml)与mRNA致敏的经辐射的自体树突状细胞(按实施例3所述方法制备)以20: 1比例置于RPMI 1640完全培养基中培养。间隔一周再刺激一次，同时加入20IU/ml IL-2。最后一次刺激后7天，收集效应细胞，同上用⁵¹Cr释放试验检测其特异性杀伤活性。靶细胞分别为HER2基因转染的CT26细胞(实施例1制备)及未转染的CT26细胞(ATCC)。

结果表明，HER2 mRNA致敏的树突状细胞疫苗可有效地免疫诱导小鼠T淋巴细胞对HER2+CT26肿瘤细胞的杀伤活性(图3)。

此外,在末次免疫后5天,在各免疫小鼠的腹部皮下接种体外培养扩增的活力良好的高表达HER2的CT26细胞(实施例1制备),剂量为 5×10^4 /只。此后每隔两天观察肿瘤出现及生长情况。记录肿瘤的大小及小鼠存活情况。

- 5 结果表明,经HER2 mRNA致敏的树突状细胞疫苗免疫后荷瘤小鼠的存活明显高于对照(图4)。

实施例5

用肿瘤细胞的总mRNA致敏的DC疫苗具有体内和体外抗肿瘤活性

10 (a) 制备DC疫苗

- 在本实施例中,重复实施例2和3,从而制得肿瘤细胞的总mRNA致敏的DC疫苗,不同点仅在于用人乳腺癌细胞株SK-BR-3(可购自美国典型培养物保藏中心,ATCC HTB-30)替换实施例1制备的高表达HER2的乳腺癌细胞系MCF-7和小鼠结肠癌细胞系CT26作为制备HER2 mRNA的原料。由于人乳腺癌细胞株SK-
15 BR-3表达HER2,因此用人乳腺癌细胞株SK-BR-3为原料制备的总mRNA仍然含有编码HER2的mRNA。

平均转染效率高达96.7%。

(b) 抗肿瘤活性测定

- 20 用实施例4相同的方法测试该用肿瘤细胞的总mRNA致敏的DC疫苗具有体内和体外抗肿瘤活性。

结果表明,该DC疫苗也能引发小鼠T淋巴细胞针对HER2阳性细胞(高表达HER2的CT26细胞和高表达HER2 MCF-7细胞)的杀伤活性(稍低于实施例3的DC疫苗)。

25

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

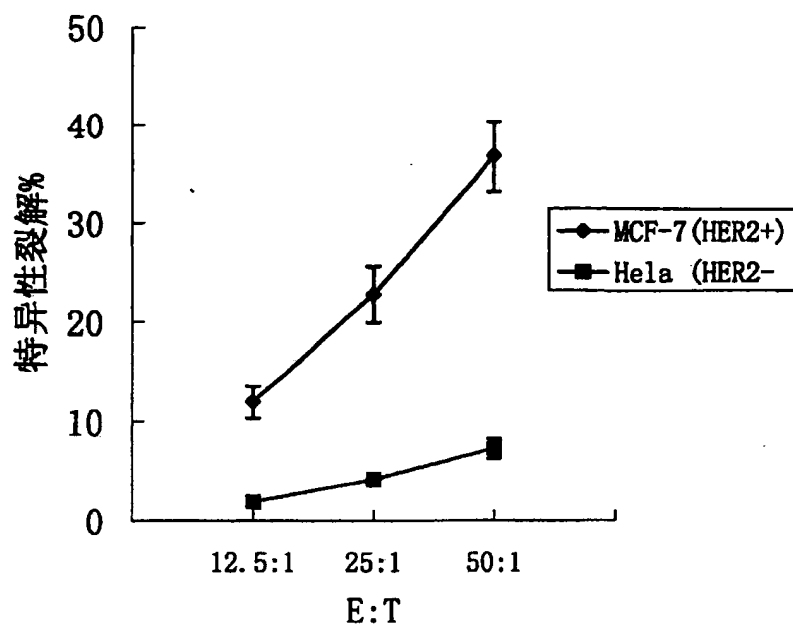


图 1

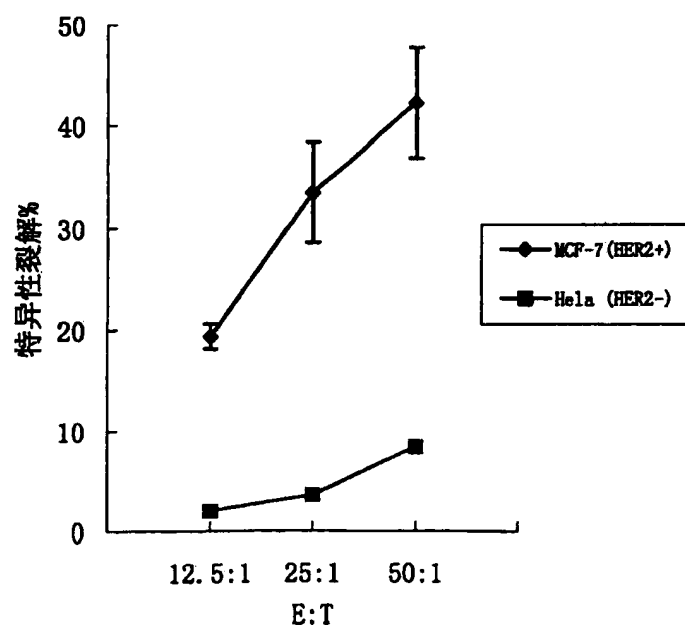


图 2

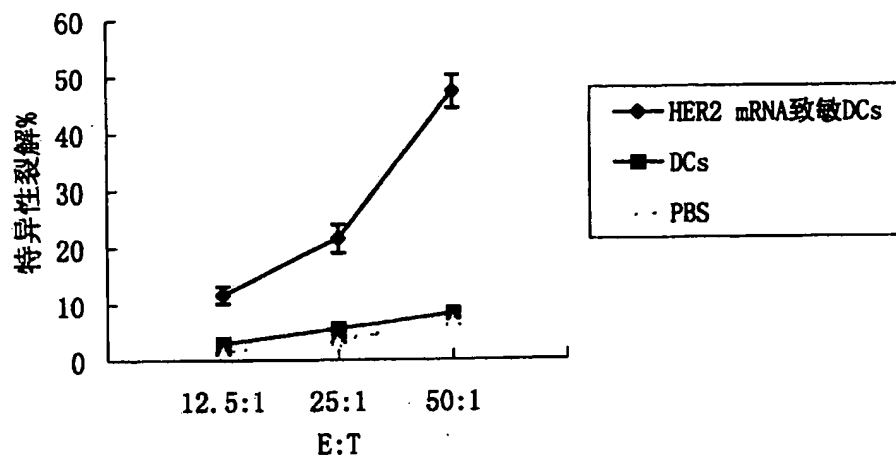


图 3

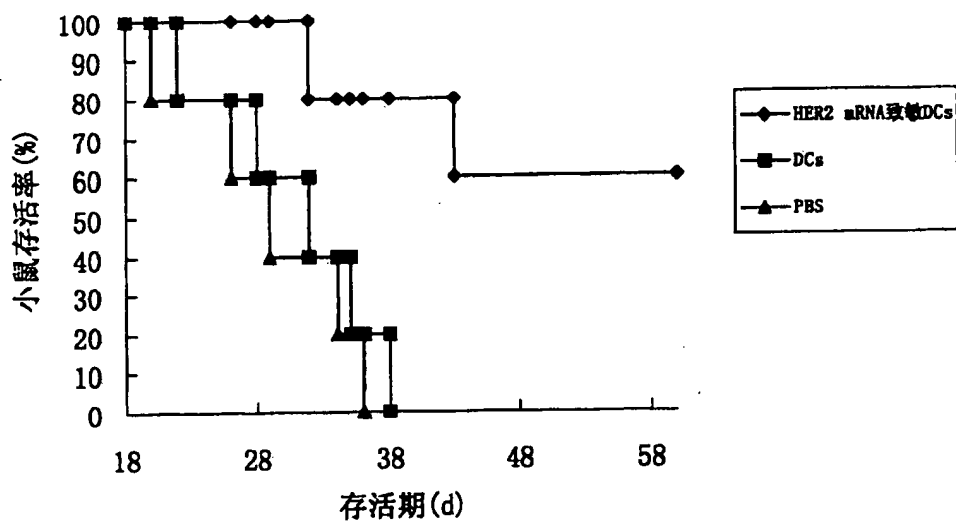


图 4